

009675253

WPI Acc No: 93-368806/199346

XRAM Acc No: C93-163742

Peptide with anticoagulant and platelet aggregation inhibitor activity - which promotes protein C activation by thrombin and is useful in treating coagulation disorders e.g. thrombosis

Patent Assignee: ASAHI KASEI KOGYO KK (ASAHI); ASAHI CHEM IND CO LTD (ASAHI)

Inventor: KONDO S; TOMA K; ZUSHI M

Number of Countries: 021 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicant	No	Kind	Date	Main IPC	Week
WO 9322447	A1	19931111	WO 93JP578	A	19930430	C12P-021/02	199346	B
JP 5310787	A	19931122	JP 92112903	A	19920501	C07K-007/10	199351	
AU 9342717	A	19931129	AU 9342717	A	19930430	C12P-021/02	199411	

Priority Applications (No Type Date): JP 92112903 A 19920501

Cited Patents: EP 290419; JP 2019399; JP 3133380; JP 63301791

Patent Details:

Patent	Kind	Lat	Pg	Filing Notes	Application	Patent
WO 9322447	A1	J	84			
				Designated States (National): AU CA KR US		
				Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE		
JP 5310787	A		23			
AU 9342717	A			Based on	WO 9322447	

Abstract (Basic): WO 9322447 A

Peptides of formula A-B-C1-D-C2-E-C3-F-C4-G-C5-H-C6 (I) are new, where A and C1-C6 are (a) ASP, GLU or GLA (GLA = gamma-carboxyglutamic acid) or (b) a chain of two or more residues selected from ASP, GLU and/or GLA; B is a 3-58 residue peptide chain; D,E,F,G and H are absent or are 1-25 residue peptide chains. B is pref. a peptide of the sequence.

PRO-CYS-PHE-ARG-ALA-ASN-CYS-GLU-TYR
-GLN-CYS-GLN-PRO-LEU-ASN-GLN-THR - SER-TYR-LEU-CYS-VAL-CYS-ALA-GLU-GLY
-PHE-ALA-PRO-ILE-PRO-HIS-GLU-PRO - HIS-ARG-CYS-GLN-MET-PHE-CYS-ASN-GLN
-THR-ALA-CYS-PRO-ALA-ASP-CYS-ASP- PRO-ASN-THR-GLN-ALA-SER-CYS (II).

The following peptide (I) is excluded A = ASP; B = (II); C1 = GLU; D = CYS-PRO; C2 = GLU; E = GLY-TYR-ILE-LEU; C3 = ASP-ASP; F = GLY-PHE-ILE-CYS-THR; C4 = ASP; G = ILE; C5 = ASP-GLU; C6 = GLU; H = CYS-GLU-ASN-GLY -GLY-PHE-CYS-SER- GLY-VAL-CYS-HIS-ASN -LEU-PRO-GLY-THR-PHE. Opt. a sequence CYS-ILE-CYS-GLY-PRO -ASP-SER-ALA-LEU -VAL-ARG-HIS-ILE-GLY -THR-ASP-CYS (III) may be attached at the C-terminal of peptide (I).

USE/ADVANTAGE - Peptides (I) are inhibitors of the blood coagulant and platelet aggregation activities of thrombin and promote the protein-C activation effect of thrombin. They can be produced efficiently in pure form by culture of appropriate transformants, and are useful in treatment of circulatory disorders such as myocardial infarction, thrombosis, embolism, telangiectaxis, arteriosclerosis obliterans, disseminated intravascular coagulation, angina pectoris, gestosis and transient ischemic attack.

Dwg.0/11

Title Terms: PEPTIDE; ANTICOAGULANT; PLATELET; AGGREGATE; INHIBIT; ACTIVE; PROMOTE; PROTEIN; ACTIVATE; THROMBIN; USEFUL; TREAT; COAGULATE; DISORDER; THROMBOSIS

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-007/10; C12P-021/02

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; C07K-013/00

File Segment: CPI

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-310787

(43)公開日 平成5年(1993)11月22日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 7/10	ZNA	8318-4H		
A 61 K 37/02	ACB	8314-4C		
C 07 K 13/00		8619-4H		
		8931-4B	C 12 N 15/00	A
		7236-4B	5/00	B

審査請求 未請求 請求項の数10(全 23 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-112903	(71)出願人	000000033 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(22)出願日	平成4年(1992)5月1日	(72)発明者	岡部 通孝 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業 株式会社内
		(72)発明者	近藤 修平 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業 株式会社内
		(72)発明者	戸▲間▼一孔 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業 株式会社内
		(74)代理人	弁理士 小林 和憲

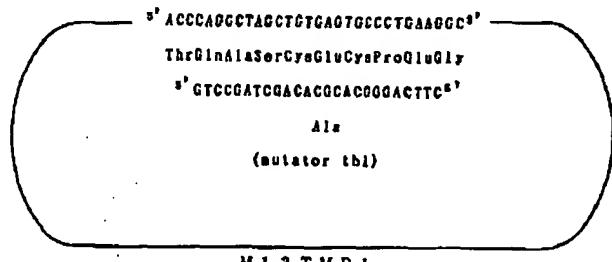
(54)【発明の名称】 新規なポリペプチド

(57)【要約】

【目的】 トロンビンの血液凝固及び血小板凝集作用に対する阻害作用及び/または、トロンビンのプロテインC活性化の促進作用を有する新規なポリペプチドを得るものである。

【構成】 ヒトトロンボモジュリンのアミノ酸配列中ににおいて、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を発現する際のトロンビンとの結合に重要な役割を果たすアミノ酸残基を同定し、様々な強度のトロンビン結合性を有するトロンボモジュリンを作製したものである。

【効果】 トロンビンの血液凝固及び血小板凝集作用に対する阻害作用及び/または、トロンビンのプロテインC活性化の促進作用を有することから、血液凝固を伴う疾患に対する治療及び予防としての医薬品に有用である。



M I S T M D I

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(A) - (B) - (C) - (D) - (C) - (E) -
(C) - (F) - (C) - (G) - (C) - (H) -
(C)

(但し、A及びCは、AspまたはGluおよびGlaのみからなるアミノ酸残基または、ペプチド残基、またはAspとGluおよびGlaから成る群から選ばれる少なくとも2個以上の組み合せよりなるペプチド残基である。Bは、任意のアミノ酸残基または、ペプチド残基であり、その長さは、アミノ酸残基数として、0以上58以下のものである。D、E、F、G、Hは、任意のアミノ酸残基または、ペプチド残基であり、その長さは、アミノ酸残基数として、0以上25以下のものである。なお、前記Glaは、γ-カルボキシグルタミン酸残基を示す)。

【請求項2】 以下のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(A) - Pro - Cys - Phe - Arg - Ala - Asn - Cys - Glu - Tyr - Gln - Cys - Gln - Pro - Leu - Asn - Gln - Thr - Ser - Tyr - Leu - Cys - Val - Cys - Ala - Glu - Gly - Phe - Ala - Pro - Ile - Pro - His - Glu - Pro - His - Arg - Cys - Gln - Met - Phe - Cys - Asn - Gln - Thr - Ala - Cys - Pro - Ala - Asp - Cys - Asp - Pro - Asn - Thr - Gln - Ala - Ser - Cys - (C) - (D) - (C) - (E) - (C) - (F) - (C) - (G) - (C) - (H) - (C)

(但し、AおよびCは、AspまたはGluおよびGlaのみからなるアミノ酸残基または、ペプチド残基、またはAspとGluおよびGlaから成る群から選ばれる少なくとも2個以上の組み合せよりなるペプチド残基である。D、E、F、G、Hは、任意のアミノ酸残基または、ペプチド残基であり、その長さは、アミノ酸残基数として、0以上25以下のものである。なお、前記Glaは、γ-カルボキシグルタミン酸残基を示す)。

【請求項3】 以下のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(A) - Pro - Cys - Phe - Arg - Ala - Asn - Cys - Glu - Tyr - Gln - Cys - Gln - Pro - Leu - Asn - Gln - Thr - Ser - Tyr - Leu - Cys - Val - Cys - Ala - Glu - Gly - Phe - Ala - Pro - Ile - Pro - His - Glu - Pro - His - Arg - Cys - Gln - Met - Phe - Cys - Asn - Gln - Thr - Ala - Cys - Pro - Ala - Asp - Cys - Asp - Pro - Asn - Thr - Gln - A

2

La - Ser - Cys - (C) - (D) - (C) - (E) - (C) - (F) - (C) - (G) - (C) - (H) - (C) - Cys - Ile - Cys - Gly - Pro - Asp - Ser - Ala - Leu - Val - Arg - His - Ile - Gly - Thr - Asp - Cys
(但し、A及びCは、AspまたはGluおよびGlaのみからなるアミノ酸残基または、ペプチド残基、またはAspとGluおよびGlaから成る群から選ばれる少なくとも2個以上の組み合せよりなるペプチド残基である。D、E、F、G、Hは、任意のアミノ酸残基または、ペプチド残基であり、その長さは、アミノ酸残基数として、0以上25以下のものである。なお、前記Glaは、γ-カルボキシグルタミン酸残基を示す)。

【請求項4】 請求項1または2または3記載のポリペプチドをコードするDNAと該DNAを組み込んだ組換え体DNA。

【請求項5】 請求項4に記載した組換え体DNAにより形質転換された微生物または動物細胞。

【請求項6】 請求項4に記載した組換え体DNAにより形質転換される微生物のうち糸状菌に属する微生物。

【請求項7】 請求項4に記載した組換え体DNAにより形質転換される微生物のうちAcromonium chrysogenumに属する微生物。

【請求項8】 請求項4に記載した組換え体DNAにより形質転換された微生物または動物細胞を培養することにより請求項1または2または3記載のポリペプチドを製造する方法。

【請求項9】 請求項8により得られた培養液。

【請求項10】 請求項8において製造されるポリペプチド；及び少なくとも1種の薬剤として投与可能な抗体、希釈液または、賦形剤を含有し、トロンビンの血液凝固及び血小板凝集作用に対する阻害作用及び／またはトロンビンのプロテインC活性化の促進作用を有することを特徴とする医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規なポリペプチドに関するものである。また、本発明は、特にトロンビンの血液凝固及び血小板凝集作用に対する阻害作用及び／または、トロンビンのプロテインCの活性化を促進する作用を有するペプチド及び、これらのペプチドを用いた医薬組成物に関するものである。これらのペプチドは、血液の凝固に対する抗凝固系や線溶系に関与することから医薬品、特に血液凝固障害を伴う疾患、例えば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内凝固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症等の治療剤として有用である。

【0002】本明細書において、アミノ酸配列及びペプチドは下記に示すIUPAC-IUB生化学命名委員会(CNB)で採用された略号を用いて表される。なお、

アミノ酸などに関し光学異性体がありうる場合は、特に明示しない限りL体を表しペプチドのアミノ酸配列の左端及び右端はそれぞれN末端およびC末端である。

【0003】Gln：グルタミン残基

Asp：アスパラギン酸残基

Pro：プロリン残基

Tyr：チロシン残基

Val：バリン残基

Lys：リジン残基

Glu：グルタミン酸残基

Ala：アラニン残基

Asn：アスパラギン残基

Leu：ロイシン残基

Pho：フェニルアラニン残基

Gly：グリシン残基

His：ヒスチジン残基

Ser：セリン残基

Thr：スレオニン残基

Ile：イソロイシン残基

Trp：トリプトファン残基

Arg：アルギニン残基

Met：メチオニン残基

Cys：システィン残基

Gla：γ-カルボキシグルタミン酸残基

【0004】またポリデオキシヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドは、下記の如き略号で表されるデオキシリボヌクレオチドの配列によって表記する。

A：アデニン（デオキシアデニル酸）

C：シトシン（デオキシシチジル酸）

G：グアニン（デオキシグアニル酸）

T：チミン（デオキシチミジル酸）

別段記載のない限り、デオキシリボヌクレオチド配列の左端及び右端はそれぞれ5'末端及び3'末端である。

【0005】

【従来の技術】血液凝固機構において重要な役割を演じているビタミンK依存性の蛋白質としてプロテインCが知られている。近年、そのプロテインCの活性化を促進し、トロンビンの作用による血小板の活性化とフィブリン形成を抑制するような物質が、ウサギの肺、ヒトの肺や胎盤等に存在することが報告され、それらはトロンボモジュリン（Thrombomodulin）と称されている。

【0006】また、N. L. Esmonら [J. Biol. Chem. 257. 859-864 (1982)] は、ウサギ肺より精製した上記物質が、トロンビンと結合し、プロテインCを活性化する際にカルシウムイオンを必要とする事を報告している。また、K. Suzukiら [Biochim. Biophys. Acta, 882. 343-352 (1986)] は、ウシ肺より精製した物質について H. H. Salemら [J.

Biol. Chem., 259. 12246-12251 (1984)] は、ヒト胎盤より精製した上記物質について同様に、トロンビンと結合後、プロテインCを活性化する際にカルシウムイオンが必要であると報告している。

【0007】さらに、S. Kurokawaら [J. Biol. Chem., 262. 2206-2212 (1987)] は、ウサギ肺より精製した上記物質をエラスターゼで切断した可溶性のペプチドは、プロテインCの

活性化の際には、0.3 mMのカルシウムイオン濃度で活性の極大値を示し、Glaドメインを取り除いたプロテインC（以下GDPcと略す）の活性化の際にはそのようなカルシウムイオン濃度依存性を示さないことを報告している。ところで、ヒト由来の上記物質のcDNAのクローニングについては、本発明者らは先に明らかにした。[S. Yamamotoら国際公開番号WO 88/05033参照]。

【0008】一方、近年の遺伝子操作技術の進歩により、蛋白質中の任意のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したり、蛋白質中の任意の部位のアミノ酸配列を欠失あるいは挿入することが可能になった。このように天然に存在する蛋白質を改変して特定の目的にかなった新しい蛋白質を創製する研究がなされている。ヒトトロンボモジュリンについては、本発明者らは、115アミノ酸からなるペプチドがトロンビンによるプロテインCの活性化を促進する活性を有していることを既に明らかにした。

[M. Zushiら, J. Biol. Chem. 264. 10351-10353 (1989) 参照] 更に、この115アミノ酸のペプチドのC末端側の38アミノ酸を欠失した変異体（E45）を構築し、その活性を調べたところ、十分な活性を有するものの114アミノ酸のペプチドの約10分の1に活性が低下することが明らかになった。[本発明者ら, J. Biol. Chem. 265. 20156-20159 (1990)] 更に、この115アミノ酸のペプチドのN末端側の1アミノ酸（Val）を欠失した変異体（E45-N1）を構築し、その活性を調べたところ、十分な活性を有していた。

【0009】[本発明者ら, J. Biol. Chem. 266. 19886-19889 (1991)] 本発明者らは、更に、この上記ペプチド中において、トロンボモジュリンのプロテインC結合能付与配列およびトロンボモジュリンのトロンビン結合部位を含むアミノ酸配列がトロンビンのプロテインC活性化を促進する作用に必須な領域であるということを明らかにした。[本発明者ら、特願平3-282369参照] また、トロンビンに関してはその分子の表面における正電荷を持つ領域が他の蛋白分子例えは、血液凝固阻止作用を有するヒルジンとの結合に関与しているということが明らかになってい

る。[Rydelら, Science 249, 277-

280 (1990)】。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】血液凝固障害の治療における蛋白製剤の投与方法としては、点滴による静注、経皮経管冠動脈再疊通〔PTCR (percutaneous transluminal coronary recanalization)〕による局所投与等が主流である。このような投与方法は、短期的な治療においては許容できるが、長期にわたる治療が必要な患者、あるいは予防的な投与が必要な患者に対しては問題である。なぜなら、蛋白質が高分子量を有することから、一定の効果を得るために比較的大量の製剤の投与が必要となるが、この場合、抗原性発現の危険を患者に与えることがあるからである。更に、長期間の通院が患者にとって精神的、経済的負担になる。ヒトトロンボモジュリンの投与方法としても現在可能と考えられているのは、静注によるものである。

【0011】このような状況から、より高い活性を有する、抗原性発現の可能性が低いより低分子のトロンボモジュリン活性を有するペプチドの開発が望まれている。また、静注、局所投与等によらない投与方法たとえば、経口あるいは、経鼻投与の可能なトロンボモジュリン製剤の開発も望まれている。本発明の目的は、上記の要望に応えるトロンビンによるプロテインCの活性化を促進するトロンボモジュリン様作用を有する新規なポリペプチドを提供することにある。本発明の他の目的は、上記のポリペプチドをコードするDNAを提供することにある。本発明の更に他の目的は、上記のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換えDNAを提供することにある。本発明の更に他の目的は、上記のような組換えDNAによって形質転換された微生物、及び動物細胞を提供することにある。本発明の更に他の目的は、上記のような組換えDNAによって形質転換された微生物、及び動物細胞を培養することによる上記ポリペプチドの製造方法を提供することにある。本発明の更に他の目的は、上記ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物を提供することにある。

【0012】

【課題を解決しようとする手段】前述のように、本発明者らは、遺伝子組換えの手法を用いてトロンビンのプロテインCの活性化を促進するペプチドの研究を進めていたが、ヒトトロンボモジュリンの575個よりなるアミノ酸配列中において、115個のアミノ酸からなるペプチドが上記活性を有していることを先に明らかにした〔M. Zushiら、J. Biol. Chem., 264, 10351-10353 (1989) 参照〕。本発明者らは、更に、上記ペプチド中において、トロンビンのプロテインC活性化を促進する作用に必須な領域として、トロンボモジュリンのプロテインC結合能付与配列およびトロンボモジュリンのトロンビン結合部位を含

むアミノ酸配列の同定に成功した。〔本発明者ら、特願平3-282369参照〕。

【0013】本発明者らは、上記のトロンボモジュリンのトロンビンのプロテインC活性化に対する促進活性の発現の際に必要なトロンビンとの結合部位を含むアミノ酸配列中において、トロンビンとの結合に必要なアミノ酸残基を同定すべく、負電荷の側鎖を持つアミノ酸残基11個に着目し、電荷を持たないアミノ酸、たとえばAlaへの置換を行ない、変異体蛋白を精製しそのトロンビンのプロテインC活性化に対する促進活性の比活性を測定したところ、驚くべきことに、様々な強度のトロンビン結合性を有するトロンボモジュリンが得られた。いくつかのアミノ酸残基については、その置換により活性が大きく変化し、トロンビンとの結合に関与する事が明らかになった。前述の特許請求の範囲において示す配列でAで示すのが前述の従来の技術で述べたプロテインC結合部位であり、Cで示すのが今回同定したトロンビン結合部位である。この知見により、トロンビンとの結合部位である残基及び、その周辺の残基の改変により、様々な強度のトロンビン結合性を有するトロンボモジュリンを得ることが可能になった。

【0014】更に、このペプチドが、動物細胞、及び各種微生物において効率よく発現されることを確認し、これらの知見に基づいて本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、以下のアミノ酸配列からなるポリペプチドを提供する。

(A) - (B) - (C) - (D) - (E) -
(C) - (F) - (C) - (G) - (C) - (H) -
(C)

30 (但し、A及びCは、AspまたはGluおよびGlyのみからなるアミノ酸残基または、ペプチド残基、またはAspとGluおよびGlyから成る群から選ばれる少なくとも2個以上の組み合せよりなるペプチド残基である。Bは、任意のアミノ酸残基または、ペプチド残基であり、その長さは、アミノ酸残基数として、0以上58以下のものである。D、E、F、G、Hは、任意のアミノ酸残基または、ペプチド残基であり、その長さは、アミノ酸残基数として、0以上25以下のものである。なお、前記Glyは、γ-カルボキシグルタミン酸残基を示す)。

【0015】本発明はまた、以下のアミノ酸配列からなるポリペプチドを提供する。

(A) - Pro - Cys - Phe - Arg - Ala - Asn - Cys - Glu - Tyr - Gin - Cys - Gin - Pro - Leu - Asn - Gin - Thr - Ser - Tyr - Leu - Cys - Val - Cys - Ala - Gly - Phe - Ala - Pro - Ile - Pro - His - Glu - Pro - His - Arg - Cys - Gin - Met - Phe - Cys - Asn - Gin - Thr - Ala - Cys - Pro - Ala - Asp -

Cys-Asp-Pro-Asn-Thr-Gln-Ala-Ser-Cys-(C)-(D)-(C)-(E)-(C)-(F)-(C)-(G)-(C)-(H)-(C)

(但し、AおよびCは、AspまたはGluおよびG1aのみからなるアミノ酸残基または、ペプチド残基、またはAspとGluおよびG1aから成る群から選ばれる少なくとも2個以上の組み合せよりなるペプチド残基である。D、E、F、G、Hは、任意のアミノ酸残基または、ペプチド残基であり、その長さは、アミノ酸残基数として、0以上25以下のものである。なお、前記G1aは、γ-カルボキシグルタミン酸残基を示す)。

【0016】本発明はまた、以下のアミノ酸配列からなるポリペプチドを提供する。

(A)-Pro-Cys-Phe-Arg-Ala-Asn-Cys-Glu-Tyr-Gln-Cys-Gln-Pro-Leu-Asn-Gln-Thr-Ser-Tyr-Leu-Cys-Val-Cys-Ala-Glu-Gly-Phe-Ala-Pro-Ile-Pro-His-Glu-Pro-His-Arg-Cys-Gln-Met-Phe-Cys-Asn-Gln-Thr-Ala-Cys-Pro-Ala-Asp-Cys-Asp-Pro-Asn-Thr-Gln-Ala-Ser-Cys-(C)-(D)-(C)-(E)-(C)-(F)-(C)-(G)-(C)-(H)-(C)-Cys-Ile-Cys-Gly-Pro-Asp-Ser-Ala-Leu-Val-Aрг-His-Ile-Gly-Thr-Asp-Cys
(但し、A及びCは、AspまたはGluおよびG1aのみからなるアミノ酸残基または、ペプチド残基、またはAspとGluおよびG1aから成る群から選ばれる少なくとも2個以上の組み合せよりなるペプチド残基である。D、E、F、G、Hは、任意のアミノ酸残基または、ペプチド残基であり、その長さは、アミノ酸残基数として、0以上25以下のものである。なお、前記G1aは、γ-カルボキシグルタミン酸残基を示す)。

【0017】更に、本発明は、上述した3つのペプチドについてそれをコードするDNAと該DNAをベクターに組み込んだ組換えDNAを提供する。更に、本発明は、前記組換えDNAによって形質転換された微生物、または動物細胞を提供する。更に、本発明は、上述した組換えDNAによって形質転換された微生物、及び動物細胞を培養することにより上述した3つのペプチドいずれかを製造する方法を提供する。更に、本発明は、トロンビンの血液凝固及び血小板凝集作用に対する阻害作用及び/又はトロンビンのプロテインC活性化の促進作用を有することを特徴とする上述した3つのペプチドいずれかを有効成分として含有する医薬組成物を提供する。

【0018】本発明らは、本発明の完成に至る過程において、まずヒトトロンボモジュリンのトロンビンとの結

合に關わる残基の同定を行なった。即ち、本発明者らが先に明らかにしたヒトトロンボモジュリンの全アミノ酸

(配列表)中の1番目から516番目のアミノ酸配列をコードするDNA断片をM13ファージベクターにサブクローニングし、公知の部位特異的変異の手法を用い、さきに明らかにしたヒトトロンボモジュリンのトロンビン結合部位である19アミノ酸の配列中及びその近傍に存在する負電荷の側鎖を持つアミノ酸(アスパラギン酸、またはグルタミン酸)をコードする位置のDNAの塩基の置換を行ない、それぞれの位置のアミノ酸を他のアミノ酸、例えばAlaに置換したペプチドをコードするDNAを作製した。

【0019】これらのDNAを動物細胞の発現ベクターであるpSV2を用いて、COS-1細胞において発現させ、イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、そのトロンビンによるプロテインCの活性化促進能を測定したところ、後述の実施例1に記載したように特定の位置のアミノ酸についてはAlaへの置換によりトロンビンのプロテインCの活性化促進能が大きく減少することがわかった。その位置のアミノ酸残基がトロンビンとトロンボモジュリンの結合に関して重要な役割を果たしていることが明らかになった。よって、この結合に関与するアミノ酸残基及びその周辺の残基を他のアミノ酸に置換したり、アミノ酸配列を挿入あるいは欠失させることによりトロンビンに対する結合の強度を変化させ、結果的にトロンビンのプロテインC活性化の促進作用が向上した変異体を得ることが可能になった。よって、本発明は、トロンビンのプロテインCの活性化を促進する作用を有する新規なポリペプチドを提供する。本発明は、更に、トロンボモジュリンの投与方法として静注によらない投与、例えば、経口投与、経鼻投与を可能にする新規なポリペプチドを提供する。

【0020】本発明により提供されるペプチドは、下記の式(I)または、(II)または、(III)で表されるアミノ酸から実質的になるものである。

式(I) :

(A)-(B)-(C)-(D)-(C)-(E)-(C)-(F)-(C)-(G)-(C)-(H)-(C)

40 (但し、A及びCは、AspまたはGluおよびG1aのみからなるアミノ酸残基または、ペプチド残基、またはAspとGluおよびG1aから成る群から選ばれる少なくとも2個以上の組み合せよりなるペプチド残基である。Bは、任意のアミノ酸残基または、ペプチド残基であり、その長さは、アミノ酸残基数として、0以上58以下のものである。D、E、F、G、Hは、任意のアミノ酸残基または、ペプチド残基であり、その長さは、アミノ酸残基数として、0以上25以下のものである。なお、前記G1aは、γ-カルボキシグルタミン酸残基を示す)。

【0021】式(II) :

(A) - Pro-Cys-Phe-Arg-Ala-Ala-Ser-Glu-Tyr-Gln-Cys-Gln-Pro-Leu-Asn-Gln-Thr-Ser-Tyr-Leu-Cys-Val-Cys-Ala-Glu-Gly-Phe-Ala-Pro-Ile-Pro-His-Glu-Pro-His-Arg-Cys-Gln-Met-Phe-Cys-Asn-Gln-Thr-Ala-Cys-Pro-Ala-Asp-Cys-Asp-Pro-Asn-Thr-Gln-Ala-Ser-Cys-(C)-(D)-(C)-(E)-(C)-(F)-(C)-(G)-(C)-(H)-(C)

(但し、A及びCは、AspまたはGluおよびGlyのみからなるアミノ酸残基または、ペプチド残基、またはAspとGluおよびGlyから成る群から選ばれる少なくとも2個以上の組み合せよりなるペプチド残基である。D、E、F、G、Hは、任意のアミノ酸残基または、ペプチド残基であり、その長さは、アミノ酸残基数として、0以上25以下のものである。なお、前記G1aは、γ-カルボキシグルタミン酸残基を示す)。

【0022】式(III) :

(A) - Pro-Cys-Phe-Arg-Ala-Ala-Ser-Glu-Tyr-Gln-Cys-Gln-Pro-Leu-Asn-Gln-Thr-Ser-Tyr-Leu-Cys-Val-Cys-Ala-Glu-Gly-Phe-Ala-Pro-Ile-Pro-His-Glu-Pro-His-Arg-Cys-Gln-Met-Phe-Cys-Asn-Gln-Thr-Ala-Cys-Pro-Ala-Asp-Cys-Asp-Pro-Asn-Thr-Gln-Ala-Ser-Cys-(C)-(D)-(C)-(E)-(C)-(F)-(C)-(G)-(C)-(H)-(C)-Cys-Ile-Cys-Gly-Pro-Asp-Ser-Ala-Leu-Val-Arg-His-Ile-Gly-Thr-Asp-Cys

(但し、A及びCは、AspまたはGluおよびGlyのみからなるアミノ酸残基または、ペプチド残基、またはAspとGluおよびGlyから成る群から選ばれる少なくとも2個以上の組み合せよりなるペプチド残基である。D、E、F、G、Hは、任意のアミノ酸残基または、ペプチド残基であり、その長さは、アミノ酸残基数として、0以上25以下のものである。なお、前記G1aは、γ-カルボキシグルタミン酸残基を示す)。

【0023】本発明のペプチド中のプロテインC結合部位であるAの長さは、結合する相手であるプロテインCのG1aドメイン中のG1a残基の数から考えて1~20残基以内、好ましくは1~10残基である。本発明のペプチドは、また、上記式(I)または、式(II)また

は、式(III)で表されるアミノ酸配列とそのN末端ま

たは/及びC末端に結合した少なくとも1種の他のペプチドのアミノ酸配列を更に含有してもよい。更に、自然の変異によりまたは、人工の変異により、ペプチドの活性に重大な変化を与えることなく、ペプチドの構造の一部を変化させることが可能であるから、本発明のペプチドは、前記のアミノ酸配列を有するペプチドの相同変異体(Homologous variant)に相当する構造を有するペプチドも包含する。

【0024】本発明のペプチドは、少なくとも1個の糖10 残基を含有してもよいし、含有していないなくてもよい。また、本発明によれば、遺伝暗号の縮重に基づき少なくとも1個の塩基が置換されている、または置換されていない上記式(I)または、式(II)または、式(II I)で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするデオキシリボ核酸が提供される。本発明のDNAは、上記式(I)または、式(II)または、式(III)で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列とその5'末端及び/又は3'末端に結合した少なくとも1種の他の塩基配列を含有してもよい。本発明によれば、上記DNAと相補的なDNAも提供される。本発明によれば、上記DNAとそれに相補的なDNAが互いに相補的に結合した2重鎖DNAを形成してもよい。

【0025】自然の変異により又は人工的変異により主たる活性に変化を与える事なく、DNAの構造及びそれから演繹されるペプチドの構造の一部を変異せしめる事が可能であるから、本発明のDNAは、前述の全てのペプチドの相同変異体に相当する構造を有するペプチドをコードする塩基配列を含有することも可能である。遺伝暗号の縮重に従い、遺伝子から生産されるポリペプチド30 のアミノ酸配列を変える事なくその遺伝子の塩基配列の少なくとも1つの塩基を他の種類の塩基に置換することができる。従って、本発明のDNAはまた、遺伝暗号の縮重に基づく置換によって変化された塩基配列から演繹されるアミノ酸配列は前に定義したアミノ酸配列と一致するから、そのようなアミノ酸配列からなるペプチドをコードする変化された塩基配列を含有することも可能である。

【0026】更にまた、本発明によれば前記の本発明の40 デオキシリボ核酸をベクターに組み込んだ組換え体DNAが提供される。該組換え体DNAは、それによって形質転換された微生物または細胞中で、本発明のペプチドを発現することができる。適したベクターの例としては、プラスマドpBR322、pBR327、pUC18、pUC19、YRp7、YEpl24(ATCC37051)、pPGACY2、pBSFAHY83、pSV2-dhfr(ATCC37146)、pBPV-1(9-1)(ATCC37111)等が挙げられる。なお発現ベクターは、宿主として使用する微生物または細胞に適したものを選択する必要がある。

【0027】更に、本発明はまた上述の組換え体DNA

で形質転換された微生物または細胞が提供される。微生物の例としては、エシェリキア コリ (*Escherichia coli*) の菌株、例えば、*E. coli* K12株294 (ATCC31446) *E. coli* B株、*E. coli* X1776 (ATCC31537)、*E. coli* C600、*E. coli* JM105；バチラス サブチラス (*Bacillus subtilis*) または、セラチアマーサンス (*Serratia marcesans*) 等の大腸菌以外の腸内菌；シードモナス (*Pseudomonas*) 属の種々の菌株；及びサッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)；アスペルギルス ニドランス (*Aspergillus nidulans*)、アクレモニウム クリソゲナム (*Acremonium chrysogenum*) (ATCC11550) 等の真菌類が挙げられる。これらの細胞のうち *E. coli* K12株294 が最も好ましい。

【0028】本発明の方法によれば、前述の本発明のDNAが正しく転写し、それによって得られるmRNAからの翻訳が正しく行われるように本発明のDNAを複製可能な発現ベクターのプロモーター等のDNA領域の下流に組み入れて該DNAを有する複製可能な組換えDNAを得、得られた該組換えDNAで微生物または細胞を形質転換させて該組換えDNAを含有する形質転換体を得る。得られた形質転換体は、該組換えDNAに与えられた表現型によって微生物または培養細胞の親細胞から単離される。得られた形質転換体を培養してデオキシリボ核酸の有する遺伝情報を発現させて本発明のペプチドを製造する。

【0029】なお、本発明のDNA及び組換えDNAを構築するために必要なDNA配列、例えばプロモーターや複製起源等をクローニングするためには原核細胞を宿主として用いる宿主-ベクター系を使用するのが好ましい。原核細胞の例としては、エシェリキア コリ (*Escherichia coli*) の菌株、例えば、*E. coli* K12株294 (ATCC31446) *E. coli* B株、*E. coli* X1776 (ATCC31537)、*E. coli* C600、*E. coli* C600hf1並びに*E. coli* W3110 (F-、λ-プロトロフィック、ATCC27375)；バチラス サブチラス (*Bacillus subtilis*) のごとき *Bacillus* の属の菌株；サルモネラチフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) または、セラチアマーサンス (*Serratia marcesans*) 等の大腸菌以外の腸内菌；シードモナス (*Pseudomonas*) 等の種々の菌株。

(*Saccharomyces cerevisiae*)；アスペルギルス ニドランス (*Aspergillus nidulans*)、アクレモニウム クリソゲナム (*Acremonium chrysogenum*) (ATCC11550) 等の真菌類が挙げられる。これらの細胞のうち *E. coli* K12株294 が最も好ましい。

【0030】上記微生物を宿主として使用する場合は、これら微生物に適したプラスミドベクターが組換え体DNAの複製可能な発現ベクターとして一般に用いられる。例えば大腸菌を形質転換するためのプラスミドベクターとしては、pBR322やpBR327や、pUC18、pUC19等を用いることができる。プラスミドベクターは、通常複製起源、プロモーター、及び組換え体DNAで形質転換した細胞を選択するのに有用な表現型を組換え体DNAに与えるマーカー遺伝子等を含んでいる。プロモーターの例としては、β-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター、トリプトファンプロモーター等が挙げられる。マーカー遺伝子の例としては、アンピシリン耐性遺伝子やテトラサイクリン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

【0031】一方、本発明のDNAを発現して本発明のペプチドを製造するためには上記の原核細胞を宿主として用いる宿主-ベクター系及び脊椎動物の細胞等の真核生物の細胞を宿主細胞として用いる宿主-ベクター系を使用することができる。真核細胞の例としては、前述の動物の細胞株等の細胞が挙げられる。本発明のDNAを前述の真核細胞で発現させるために、本発明の組換え体DNAは、一般に遺伝子発現を制御するための機能配列、例えば、複製起源、本発明のDNAの上流に位置すべきプロモーター、リボゾーム結合部位、ポリアデニル化部位や転写終止配列を含有している。本発明のDNAを真核細胞内で発現させるのに用いることができる、そのような機能配列はウイルスやウイルス性物質から得ることができる。

【0032】例えば、本発明で用いることができるプロモーターは、アデノウイルス2、ポリオーマウイルス、シミアンウイルス40 (SV40) 等から得ることができる。特にアデノウイルス2の主後期プロモーターやSV40の初期及び後期プロモーターが好ましい。また、トロンビンのプロテインC活性化を促進する作用を有するヒト肺由来のペプチドをコードする遺伝子の上流の位置に本来存在するプロモーターも、上述の宿主-ベクター系で使用するのに適しているならば使用することができる。

【0033】複製起源については、外来性の起源、例えば、アデノウイルス、ポリオーマ、SV40水泡性口内炎ウイルス (VSV)、ウシ乳頭腫ウイルス (BPV) 等のウイルス由来の複製起源を用いることができる。また、発現ベクターとして宿主染色体に組み込まれるよう

な性質を有するベクターを用いる場合、宿主染色体の複製起源を利用することができる。本発明の複製可能な組換え体DNAで形質転換された微生物または細胞は、前述のとおり組換え体DNAに与えられた少なくとも1種の表現型によって形質転換されずに残った親細胞から選別される。表現型は少なくとも1種のマーカー遺伝子を組換え体DNAに挿入することによって与えることができる。また、複製可能な発現ベクターが本来有しているマーカー遺伝子を利用することもできる。

【0034】マーカー遺伝子の例としては、例えば、ネオマイシン耐性等の薬剤耐性遺伝子や、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（以下“DHFR”と称する）をコードする遺伝子等が挙げられる。これに関し、DHFR遺伝子をマーカー遺伝子として用いる場合、DHFRには様々なタイプがあるため、その使用するマーカー遺伝子のコードしているDHFRのタイプによって用いるべき宿主を選択しなければならない。例えば、マーカー遺伝子として野生型DHFRをコードする遺伝子を用いる場合、宿主としてはDHFR欠損株を用いるのが好ましい。

【0035】DHFR欠損株は、ヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンを要求するのでヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンを含まない培地中では生育できない。しかしながら、DHFR欠損株をDHFR遺伝子を含有する組換え体DNAで形質転換すると、その株はもはやヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンを要求しなくなり、ヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンを含まない培地中でも生育することができる。従って、形質転換細胞は、ヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンについての栄養要求性を判断基準にして形質転換されないで残った細胞から容易に選別することができる。

【0036】一方、メソトレキセート(MTX)に対する親和性の低い変異体DHFRをコードする遺伝子（以下“MTX耐性DHFR遺伝子”と称する）をマーカー遺伝子として用いる場合には、宿主細胞は、正常なDHFRをコードする遺伝子を有していてもよくDHFRを欠損している必要はない。その理由は、以下の通りである。正常DHFRは、MTXによって阻害されるため、正常DHFRをコードする遺伝子を含有する宿主細胞はMTXによって阻害されるため、正常DHFRをコードする遺伝子を含有する宿主細胞はMTXの存在下ではヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンを要求する。しかしながら、その宿主細胞が、MTX耐性DHFR遺伝子を含有する組換え体DNAで形質転換すると形質転換細胞はMTX存在下においてもはやヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンを要求しない。従って、形質転換細胞は、MTX存在下におけるヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンについての栄養要求性を判断基準として用いて形質転換されていない細胞から選択することができる。これに関し、真核細胞の大多数がMTX感受性であるのでMTX耐性DHFR遺伝子は、

マーカー遺伝子として用いるのに好都合である。

【0037】サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等の酵母も本発明のDNAを発現するための宿主として用いることができる。酵母で本発明のDNAを発現するためには複製可能な発現ベクターとして例えばプラスミドYEP24を用いることができる。プラスミドYEP24は、Ura3遺伝子を含有しており、このUra3遺伝子をマーカー遺伝子として利用することができる。

【0038】酵母発現用の発現ベクターのプロモーターの例としては、3-ホスホグリセレートキナーゼまたは、エラノーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドログナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフラクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、グルコキナーゼ等の解糖系に関与する酵素類の遺伝子のプロモーターやアルコールデヒドログナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関する酵素、ガラクトース、マルトース及びラクトースの利用に関する酵素類の遺伝子のプロモーターが挙げられる。これらのうち、アルコールデヒドログナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関する酵素、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドログナーゼ、ガラクトース、マルトース及びラクトースの利用に関する酵素類のプロモーターは、これらのプロモーターによる転写を宿主の培養条件を変えることによって制御することができるので有利である。酵母細胞中における転写や翻訳を制御するための複製起源や終止コドンおよび他のDNA配列としては、酵母細胞に適している通常の公知のDNA配列を用いることができる。

【0039】アスペルギラス・ニドランス (*Aspergillus nidulans*) 及び、アクレモニウム・クリソゲナム (*Acremonium chrysogenum*) (ATCC11550) 等の糸状菌も本発明のDNAを発現するための宿主として用いることができる。糸状菌で本発明のDNAを発現するためには発現ベクターとして例えばpPGACY2、pBSFAH Y83等は、松田ら（特願平2-166566）に記載された方法により得ることができる。

【0040】アクレモニウム・クリソゲナム用の発現ベクターのプロモーターおよび、ターミネーターの例としては、例えばホスホグリセレートキナーゼ (PGK)、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドログナーゼ (GAPD)、アクチシン等の遺伝子のプロモーター並びにターミネーターが挙げられる。これらのプロモーター及びターミネーターを含むDNA断片は、例えば、[松田ら、特願平2-166566]に記載の方法に従ってアクレモニウム・クリソゲナムの染色体ライブリーから取得できる。

【0041】形質転換した微生物または細胞は、通常の

栄養培地を用いて通常の公知の方法で培養することにより本発明のペプチドをコードするDNAを発現して本発明のペプチドを得ることができる。培養後、本発明のペプチドは、形質転換体の培養物から通常の公知の方法、例えばカラムクロマトグラフィー等を用いて単離することができる。このようにして得られたペプチドは、様々な種類と長さの糖鎖を少なくとも1種含有していてもよい。得られたペプチドが糖鎖を含有しているか否かは、用いる宿主の種類によって異なる。また、ペプチドが糖鎖を含有している場合の糖鎖の種類や長さも用いる宿主の種類によって異なる。

【0042】一般に翻訳開始シグナルのATGから翻訳されるペプチドは、宿主細胞から分泌されるときにプロセッシングを受けて成熟蛋白になることが知られている。本発明のペプチドの場合もそのようなプロセッシングを受けることがある。ペプチドがプロセッシングを受ける部位は、宿主により、または培養条件により変化する場合がある。例えば、本発明のペプチドが上記式(I)または、(II)または、(III)で表されるペプチドとリーダー配列を含むプロセッシングを受けない未成熟形で形質転換細胞中で產生される場合、その未成熟ペプチドは、プロセッシングを受けてリーダー配列が削除されて成熟形となることがある。しかしながら、前述のように未成熟ペプチドのプロセッシングを受ける位置は使用する宿主の種類や宿主の培養条件により変化するので必ずしも上記のようなプロセッシングが起きるとは限らない。

【0043】また、他の蛋白のリーダー配列を用いても本発明のペプチドを発現させることができる。更に特定の蛋白のリーダー配列を使用すればそれに続くペプチドのアミノ酸に修飾を行うことができる。例えば、プロトロンビン、血液凝固第IX因子、血液凝固第X因子、血液凝固第VII因子、プロテインC、プロテインS等のリーダー配列を用いれば、それに続くペプチド中のN末端部分付近のグルタミン酸をγ-カルボキシル化することができる。[B. Furieら、Blood, 75, 9, 1753-1762 (1990)]前述のとおり、本発明のペプチドは、組換えDNA技術を用いる方法により製造することができる。又、本発明のペプチドは、通常の公知の方法により例えば市販の自動ペプチド合成装置等を用いて有機合成により製造することもできる。

【0044】本発明のペプチドは、トロンビンの血液凝固及び血小板凝集作用に対する阻害作用及び、または、トロンビンのプロテインC活性化の促進作用を有する。プロテインCは、血液凝固線溶機構において重要な役割を演じているビタミンK依存性の蛋白であり、トロンビンの作用により活性化される。活性型プロテインCは、生体内で血液凝固系の補酵素の活性型第V因子、及び活性型第VIII因子を失活させ、また血栓溶解作用を有するプラスミノーゲンアクチベーターの产生に関与している

ことが知られている。[鈴木宏治、医学の歩み、第125巻、901頁、(1983)]従って、本発明のペプチドは、生体における抗血液凝固及び血栓溶解に大きく寄与するものである。

【0045】前述のように、本発明のペプチドは、抗血液凝固と血小板凝集抑制作用および血栓溶解作用を有するので例えば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血液凝固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症等の疾患の治療及び予防に用いることができる。本発明のペプチドを上記の疾患の治療及び予防に用いる際には、薬剤として使用可能な担体と混合することができる。即ち、上記の疾患を治療または、予防するのに有効な量の本発明のペプチドを適当な量の担体と混ぜて、患者に効果的に投与するのに適した医薬組成物を調製することができる。

【0046】本発明のペプチドは、注射剤等として用いることができるばかりでなく、経口投与、粘膜投与、例えば鼻粘膜を介しての投与も可能な組成物を調製することもできる。本発明のペプチドの成人1回当たりの投与量は、年齢、性別、体重、症状等によって異なるが、一般に、約0.1~200mgであり、1日当たり1回または、必要に応じて数回投与する。

【0047】

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明を詳しく説明するが、本発明は、これらの例になんら限定されるものではない。

実施例1

ヒトトロンボモジュリンのトロンビンとの結合能を付与するアミノ酸残基の同定

(1) pSV2TMD1の構築

国際出願特許(国際公開番号WO88/05053)の実施例1-(1)に記載されたpSV2TMJ2(ATCC寄託番号第67283号)をNcoIで完全消化後、切断末端をE.coil DNAポリメラーゼを用いて平滑末端にした。次いで、HindIIIで完全消化して約1900bpのDNA断片を得た。得られたDNA断片をTMJ3と称した。一方、ファージM13mp19(宝酒造、カタログ番号3119)をHindIII及び、HindIIで消化してベクターを調製した。このベクターにDNA断片TMJ3を挿入して組換え体プラスミドM13mp19TMJ3を得た。

【0048】また、別途の塩基配列: 5'-GGAGGCCGCTCAGCCCCGAATGCACG-3' (25mer) を有する削除用DNAプローブ(以下"ディリーター"と称する。) TMd1を有機合成した。このように作製したディリーターTMd1を用いて、メソッド イン エンザイモロジー(Method in Enzymology), 第100巻、468頁、(1983年)、アカデミックプレス(Academic Pr

e s s) に記載の方法にしたがつて部位特異的変異の手法で前記のごく得られた組換え体プラスミドM1 3 m p 1 9 TM J 3 の 1 7 7 b p からなる塩基配列の削除を行なつた。即ち、2 5 p m o l のディリーター-T M d 1 及び1 0 p m o l のM1 3 プライマー-M3 (宝酒造、カタログ番号3 8 3 1) の5'末端をT 4 キナーゼを用いてリン酸化した後、0. 5 p m o l の組換え体プラスミドM1 3 m p 1 9 TM J 3 のシングルストランドDNAを加え、9 5 °Cで5分間加熱後、室温にまで冷却した。

【0049】次いで、5単位のE. c o l i DNAポリメラーゼI (K l e n o w F r a g m e n t) 、及び1 0 単位のT 4 DNAリガーゼを混合物に加えて3 7 °Cで3 0 分間インキュベートして混合物中に組換え体プラスミドを生成させた。得られた混合物をE. c o l i J M1 0 5 (ファルマシア、カタログ番号2 7 - 1 5 5 0) に加えることにより組換え体プラスミドでE. c o l i をトランسفェクトした。3 7 °Cで一晩培養して生じた寒天培地上のプラークをニトロセルロースフィルター上に移し取り、8 0 °Cで2時間加熱後、プレハイブリダイゼーションを行なつた。プレハイブリダイゼーションは6 × S E T (0. 9 M N a C l 、1 8 0 mMトリス緩衝液 (pH 8. 0) 、6 mM EDTA) 、5 × D e n h a r t s' (0. 1% (w/v) ポリビニルピロリドン、0. 1% (w/v) ウシ血清アルブミン (B S A)) 、0. 1% SDS、1 0 0 μ g / ml 変性サケ精子DNAを含む溶液中で5 5 °C、2時間加温することにより実施した。次いで上記の溶液中の変性サケ精子DNAの代わりに³²PでラベルしたT M d 1 を加えた溶液を用いてハイブリダイゼーション反応を5 5 °C、2時間実施した。

【0050】次いで、6 × S S C (0. 9 M N a C l 、0. 0 9 M クエン酸三ナトリウムの水溶液) を用いてニトロセルロースフィルターを洗净した。洗净は室温で5分間、2回洗ったのち、5 5 °C、6 5 °C、7 5 °Cと段階的に温度を上げていって、それぞれ5分間2回ずつ洗った。X線フィルムX A R - 5 (イーストマンコダック) を得られたニトロセルロースフィルターに密着させて- 8 0 °C、一夜露出させたところ、X線フィルムに強く露光した黒いスポットが数10個検出された。各スポットは組換え体プラスミドで感染したクローンに対応するものである。そのうち、6クローンを選択し、各クローンの組換え体プラスミドを単離して制限酵素解析、及び塩基配列の解析を行なつたところ、これらのクローンの保有する組換え体プラスミドは、制限酵素部位と塩基配列がそれぞれ同一であるということがわかつた。

【0051】更にこのDNA断片は、配列表の開始コドン (ATG) から5 1 6番目までのアミノ酸からなるペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有することがわかつた。このDNA断片をT M D 1 と称し、このDNA断片を含む組換えプラスミドをM1 3 T M D 1 と

称した。図1に組換え体プラスミドM1 3 m p 1 9 T M J 3 とディリーター-T M d 1 がハイブリダイズしてDNA断片T M J 3 に対応するDNA領域の一部が削除されるところを示す。この組換え体プラスミドM1 3 T M D 1 のDNAをH i n d III 及びB a m H I で完全消化して、T M D 1 の約1 7 0 0 b p DNA断片を単離した。一方、プラスミドp S V 2 - d h f r (ATCC 3 7 1 4 6) をH i n d III 及びB g I I で完全消化してベクターを得、このベクターと上記1 7 0 0 b p DNA断片とをT 4 DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドp S V 2 T M D 1 を得た。

【0052】(2) トロンビン結合部位内のポイントミューテーション

(a) プラスミドp S V 2 T B 1 の構築

部位特異的変異の手法を用いてディリーター-T M d 1 の代わりに、塩基配列：5' - C T T C A G G G C A C G C A C A G C T A G C C T G - 3' (2 5 m e r) を有する変異用DNAプローブ (以下、"ミューテイター"と称する) t b 1 を用いる以外は上記実施例1 - (1) と実質的に同様の方法で、実施例1 - (1) で得られた組換え体プラスミドM1 3 T M D 1 の一部を改変して、G 1 u 4 2 6 のA 1 a への変換を行ない、T B 1 と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM1 3 T B 1 を得た。

【0053】このT B 1 は、配列表の開始コドン (AT G) から5 1 6番目までのアミノ酸からなるが、4 2 6番目のG 1 u がA 1 a に変換されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。図2に組換え体プラスミドM1 3 T M D 1 とミューテイターt b 1 がハイブリダイズしてG 1 u 4 2 6 が、A 1 a 4 2 6 に変換されているところを示す。G 1 u 4 2 6 以外に変異が起こっていないことを常法どおりシークエンシングにより確認後、この組換え体プラスミドM1 3 T B 1 のDNAをH i n d III 及びB a m H I で完全消化して、T B 1 の約1 7 0 0 b p DNA断片を単離した。一方プラスミドp S V 2 - d h f r (ATCC 3 7 1 4 6) をH i n d III 及びB g I I で完全消化してベクターを得、このベクターと上記1 7 0 0 b p DNA断片とをT 4 DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドp S V 2 T B 1 を得た。

【0054】(b) プラスミドp S V 2 T B 2 の構築
部位特異的変異の手法を用いてディリーター-T M d 1 の代わりに、塩基配列：5' - G G A T G T A G C C T G C A G G G C A C T C A C A - 3' (2 5 m e r) を有するミューテイターt b 2 を用いる以外は上記実施例1 - (1) と実質的に同様の方法で、実施例1 - (1) で得られた組換え体プラスミドM1 3 T M D 1 の一部を改変して、G 1 u 4 2 9 のA 1 a への変換を行ない、T B 2 と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM1 3 T B 2 を得た。このT B 2 は、配列表の開始コドン (A

TG) から516番目までのアミノ酸からなるが、429番目のG1uがA1aに変換されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。

【0055】図3に組換え体プラスミドM13TMD1とミューテイターtb2がハイブリダイズしてG1u429が、A1a429に変換されているところを示す。G1u429以外に変異が起こっていないことを常法どうり、シークエンシングにより確認後、この組換え体プラスミドM13TB2のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TB2の約1700bpDNA断片を単離した。一方、プラスミドpSV2-dhfr(ATCC37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記1700bpDNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TB2を得た。

【0056】(c) プラスミドpSV2TB3の構築部位特異的変異の手法を用いてディリーターTMd1の代わりに、塩基配列：5'-GCAGATGAAACC GGCGGCCAGGATGTAGCC-3' (30mer) を有するミューテイターtb3を用いる以外は上記実施例1-(1)と実質的に同様の方法で、実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1の一部を改変して、Asp434とAsp435のA1aへの変換を行ない、TB3と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TB3を得た。このTB3は、配列表の開始コドン(ATG)から516番目までのアミノ酸からなるが、434番目のAspと435番目のAspがA1aに変換されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。

【0057】図4に組換え体プラスミドM13TMD1とミューテイターtb3がハイブリダイズしてAsp434とAsp435が、それぞれA1a434とA1a435に変換されているところを示す。Asp434とAsp435以外に変異が起こっていないことを常法どうりシークエンシングにより確認後、この組換え体プラスミドM13TB3のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TB3の約1700bpDNA断片を単離した。一方、プラスミドpSV2-dhfr(ATCC37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記1700bpDNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TB3を得た。

【0058】(d) プラスミドpSV2TB4の構築部位特異的変異の手法を用いてディリーターTMd1の代わりに、塩基配列：5'-GCACTCGTCGAT GGCGTGCAGATGAA-3' (27mer) を有するミューテイターtb4を用いる以外は上記実施例1-(1)と実質的に同様の方法で、実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1の一部を改変して、Asp441のA1aへの変換を行な

い、TB4と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TB4を得た。このTB4は、配列表の開始コドン(ATG)から516番目までのアミノ酸からなるが、441番目のAspがA1aに変換されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。

【0059】図5に組換え体プラスミドM13TMD1とミューテイターtb4がハイブリダイズしてAsp441が、A1a441に変換されているところを示す。

10 Asp441以外に変異が起こっていないことを常法どうりシークエンシングにより確認後、この組換え体プラスミドM13TB4のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TB4の約1700bpDNA断片を単離した。一方、プラスミドpSV2-dhfr(ATCC37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記1700bpDNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TB4を得た。

【0060】(e) プラスミドpSV2TB5の構築20 部位特異的変異の手法を用いてディリーターTMd1の代わりに、塩基配列：5'-GCCGTTTCGCA CGCGCGATGTCCTGCA-3' (30mer) を有するミューテイターtb5を用いる以外は上記実施例1-(1)と実質的に同様の方法で、実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1の一部を改変して、Asp443とG1u444のA1aへの変換を行ない、TB5と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TB5を得た。このTB5は、配列表の開始コドン(ATG)から516番目までのアミノ酸からなるが、443番目のAspと444番目のG1uがA1aに変換されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。

【0061】図6に組換え体プラスミドM13TMD1とミューテイターtb5がハイブリダイズしてAsp443とG1u444が、それぞれA1a443とA1a444に変換されているところを示す。Asp443とG1u444以外に変異が起こっていないことを常法どうりシークエンシングにより確認後、この組換え体プラスミドM13TB5のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TB5の約1700bpDNA断片を単離した。一方、プラスミドpSV2-dhfr

40 (ATCC37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記1700bpDNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TB5を得た。

【0062】(f) プラスミドpSV2TB6の構築50 部位特異的変異の手法を用いてディリーターTMd1の代わりに、塩基配列：5'-GCCGCCGTTTGC GCACTCGT-3' (20mer) を有するミューテイターtb6を用いる以外は上記実施例1-(1)と

実質的に同様の方法で、実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1の一部を改変して、G1u446のA1aへの変換を行ない、TB6と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TB6を得た。このTB6は、配列表の開始コドン(ATG)から516番目までのアミノ酸からなるが、446番目のG1uがA1aに変換されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。

【0063】図7に組換え体プラスミドM13TMD1とミューテイターtb6がハイブリダイズしてG1u446がA1a441に変換されているところを示す。G1u446以外に変異が起こっていないことを常法どうりシークエンシングにより確認後、この組換え体プラスミドM13TB6のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TB6の約1700bpDNA断片を単離した。一方プラスミドpSV2-dhfr(ATCC37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記1700bpDNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TB6を得た。

【0064】(g) プラスミドpSV2TB7の構築
部位特異的変異の手法を用いてディリーターTMd1の代わりに、塩基配列：5'-CAGATGCACGCGAAGGTACC-3' (20mer) を有するミューテイターtb7を用いる以外は上記実施例1-(1)と実質的に同様の方法で、実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1の一部を改変して、G1u463のA1aへの変換を行ない、TB7と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TB7を得た。このTB7は、配列表の開始コドン(ATG)から516番目までのアミノ酸からなるが、463番目のG1uがA1aに変換されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。

【0065】図8に組換え体プラスミドM13TMD1とミューテイターtb7がハイブリダイズしてG1u463がA1a463に変換されているところを示す。G1u463以外に変異が起こっていないことを常法どうりシークエンシングにより確認後、この組換え体プラスミドM13TB7のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TB7の約1700bpDNA断片を単離した。一方プラスミドpSV2-dhfr(ATCC37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記1700bpDNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TB7を得た。

【0066】(h) プラスミドpSV2TB8の構築
部位特異的変異の手法を用いてディリーターTMd1の代わりに、塩基配列：5'-AGGGCCGAGGCGGGCCCGCA-3' (20mer) を有するミューテイターtb8を用いる以外は上記実施例1-(1)と

実質的に同様の方法で、実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1の一部を改変して、Asp469のA1aへの変換を行ない、TB8と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TB8を得た。このTB8は、配列表の開始コドン(ATG)から516番目までのアミノ酸からなるが、469番目のAspがA1aに変換されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。

【0067】図9に組換え体プラスミドM13TMD1とミューテイターtb8がハイブリダイズしてAsp469がA1a469に変換されているところを示す。Asp469以外に変異が起こっていないことを常法どうりシークエンシングにより確認後、この組換え体プラスミドM13TB8のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TB8の約1700bpDNA断片を単離した。一方プラスミドpSV2-dhfr(ATCC37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記1700bpDNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TB8を得た。

【0068】(i) プラスミドpSV2TB9の構築
部位特異的変異の手法を用いてディリーターTMd1の代わりに、塩基配列：5'-GAGTCACAGGCGGTGCCATT-3' (20mer) を有するミューテイターtb9を用いる以外は上記実施例1-(1)と実質的に同様の方法で、実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1の一部を改変して、Asp479のA1aへの変換を行ない、TB9と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TB9を得た。このTB9は、配列表の開始コドン(ATG)から516番目までのアミノ酸からなるが、479番目のAspがA1aに変換されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。

【0069】図10に組換え体プラスミドM13TMD1とミューテイターtb8がハイブリダイズしてAsp479がA1a479に変換されているところを示す。Asp479以外に変異が起こっていないことを常法どうりシークエンシングにより確認後、この組換え体プラスミドM13TB9のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TB9の約1700bpDNA断片を単離した。一方、プラスミドpSV2-dhfr(ATCC37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記1700bpDNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TB9を得た。

【0070】(3) COS-1細胞へのトランسفエクション
COS-1細胞(ATCC CRL1650)を組織培養用シャーレ内で、10% (v/v) のウシ胎児血清(以下FCSと称する。ギブコ社)を加えたダルベッコ

の最小必須培地（以下DMEMと称する）（フロー・ラボラトリ－社、カタログ番号10-311）を用いてコンフルエントになるまで培養した後、トリプシン液（0.25%トリプシン、0.02%EDTA含有PBS）を用いてシャーレから剥し、エレクトロポーレーション用緩衝液（272mMサッカロース、1mM MgCl₂、7mMリン酸緩衝液pH7.4）に8×10⁶個/mlの濃度となるように懸濁し、得られた細胞懸濁液500μlをエレクトロポーレーション用キュベット（バイオラッド社、カタログ番号165-2085）に入れた。

【0071】次に、実施例1-(1)で構築したプラスミドpSV2TMD1、pSV2TB1、pSV2TB2、pSV2TB3、pSV2TB4、pSV2TB5、pSV2TB6、pSV2TB7、pSV2TB8、pSV2TB9のDNAをそれぞれ4μg/μlになるように蒸留水に懸濁し、20μgのプラスミドDNAを含む懸濁液5μlを上記のキュベット内のCOS-1細胞懸濁液に加え、4℃で5分間放置した。5分後キュベットをエレクトロポーレーション装置（バイオラッド カタログ番号165-2075）に移し、3μF、450Vの条件で30秒おいて2回のパルスを与えた。その後、4℃で5分間放置後、細胞懸濁液を10%FCS(v/v)を加えたDMEM10mlの入った直径10cmの細胞培養用シャーレに移し、炭酸ガスインキュベーター内で37℃、24時間培養した。24時間後、培地を10mlのFCSぬきのDMEMに交換し、さらに48時間培養し培養液を回収した。

【0072】(4) ペプチドの精製

前述の実施例で得られた培養液それぞれを0.15M NaCl含有20mMトリス緩衝液(pH7.4)で平衡化した0.5mlのQセファロースカラムに吸着させ、0.18M NaCl含有20mMトリス緩衝液(pH7.4)で洗浄後、0.3M NaCl含有20mMトリス緩衝液(pH7.4)で溶出させた。

【0073】(5) ペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化を促進する活性の測定

上記実施例1-(3)で精製したペプチドを含む溶液をTM希釈緩衝液(0.1M NaCl、0.1%Lubrol PX(シグマ社)、0.1%NaN₃、0.001%牛血清アルブミン含有、0.02Mトリス塩酸緩衝液pH7.5)で適当に希釈した溶液5μl、トロンビン(シグマ社、カタログ番号T-6759、20ng/μl)3μl、10×アッセイ緩衝液(1M NaCl、30mM CaCl₂、1%牛血清アルブミン含有、0.5Mトリス塩酸緩衝液pH8.5)5μl、及び蒸留水29.5μlを混合し、37℃で5分間放置後、プロテインC(牛由来、0.2μg/μl)7.5μlを加え、37℃で30分間反応させた。反応は、ストップ液(100mM NaCl、0.3A₂₆₀アンチトロンビンIII、100μg/mlヘパリン含有20mMトリス塩

酸緩衝液pH7.5)を6.25μl加えることにより止めた。

【0074】活性化プロテインCの活性は、Boc-Leu-Ser-Thr-Ala-MCA(ペプチド研究所、5mg/ml)10μl、5M CsCl 5μl基質反応緩衝液(100mM NaCl含有50mMトリス塩酸緩衝液)495μlを加え、37℃で20分間反応させ、酢酸55μlを加え反応を止めた後、遊離したAMC(7-アミノ-7-メチルクマリン)濃度を励起波長380nm、発光波長440nmで蛍光分光光度計

(島津製作所RF-540)により測定した。得られた蛍光強度を既知濃度のAMCの蛍光強度と比較して、遊離したAMC量を求めた。このAMC量から本発明のペプチドを含まない水溶液を加えた時のAMC量を差し引いた値がサンプルのトロンビンによるプロテインC活性化を促進する強さを現わす。1分間に反応液1mlあたり1nMの活性化プロテインCを生成する活性を1uとした。

【0075】(6) ペプチドの定量

20 (a) 上記実施例1-(3)で精製したペプチドを含む溶液中のペプチドの量は、抗ヒトロンボモジュリンモノクローナル抗体を用いたエンザイムインムノアッセイ(以下ELISAと略す)により定量した。詳しくは次に述べる。抗TMモノクローナル抗体の作製は、Maruuyamaらの方法[J. Biol. Chem. 260, 15432 (1985)]に従った。即ち、胎盤より精製したTMを抗原とし、Balb/Cマウスに数回免疫後、マウスの脾臓細胞液を調製し、適当なラインからのマウス骨髓腫細胞とポリエチレングリコール等の融合促進剤の使用により、細胞融合させる。

【0076】細胞融合に用いるマウス骨髓腫細胞は、例えば、P3-X63-Ag8-U1細胞(P3-U1)[Yeltonら、Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1 (1978)]等が用いられる。融合した細胞を適当な選択培地、例えば、HAT(ヒポキサンチン・アミノブテリン・チミジン)培地を用いて選択する。このようにしてハイブリドーマ細胞が検出された後、その培養上清を採取し、TMに対する抗体について40 TMを固相抗原としたELISA(酵素免疫定量法)によりスクリーニングする。TMに対する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を適当な方法、例えば限外希釈法によりクローニングする。その結果、2種の抗TMモノクローナル抗体が得られ、それぞれ抗TMモノクローナル抗体1、2と命名した。

【0077】(b) プラスマドM13mp19TMD3の構築

部位特異的変異の手法を用いてディリーターTMD1の代わりに、塩基配列：5'-GGAGGCCGCTCAACAGTCGGTGCCA-3' (25mer)を有

25

するディリーターTMD3を用いる以外は上記実施例1-(1)と実質的に同様の方法で、実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13mp19TMJ3の285bpからなる塩基配列の削除を行なった。このDNA断片は、配列表の開始コドン(ATG)から480番目までのアミノ酸からなるペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有することがわかった。このDNA断片をTMD3と称し、このDNA断片を含む組換えプラスミドをM13TMD3と称した。

【0078】図11に組換え体プラスミドM13mp19TMJ3とディリーターTMD3がハイブリダイズしてDNA断片TMJ3に対応するDNA領域の一部が削除されるところを示す。更に、部位特異的変異の手法を用いてディリーターTMD1の代わりに、塩基配列：5'-GAAGCACGGGTCGGGAAACCCCAGG-3' (25mer) を有するディリーターTMD5を用いる以外は上記実施例1-(1)と実質的に同様の方法で、組換え体プラスミドM13TMD3の一部を削除して、1044塩基の削除を行ない、TMD7と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TMD7を得た。このTMD7は、配列表の開始コドン(ATG)から18番目のアミノ酸、及び367番目から480番目のアミノ酸からなるペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。

【0079】図12に組換え体プラスミドM13TMD3とディリーターTMD5がハイブリダイズしてDNA断片TMD3に対応するDNA領域の一部が削除されるところを示す。さらに、この組換え体プラスミドM13TMD7のDNAをHindIII及びBamHIで完全*

26

*消化して、TMD7の約580bpDNA断片を単離した。一方、プラスミドpSV2-dhfr (ATCC37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記580bpDNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TMD7を得た。

【0080】(c) COS-1細胞へのトランスフェクション

上記の実施例1-(1)で得られたpSV2TMD1及び実施例7-(a)で得られたpSV2TMD7のCOS-1細胞へのトランスフェクションは、前述の実施例1-(3)の方法に従った。pSV2TMD1のトランスフェクションは、30回繰り返し培養液約300mlを得た。pSV2TMD7のトランスフェクションは1回行ない培養液10mlを得た。pSV2TMD1をトランスフェクトしたCOS細胞の産生するペプチドをD123、pSV2TMD7をトランスフェクトしたCOS細胞の産生するペプチドをE456と命名した。

【0081】(d) トロンビンによるプロテインC活性化を促進する活性の測定

上記の実施例1-(7)-(b)で得られた培養液に含まれるペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化を促進する活性の測定は、前述の実施例1-(5)の方法に従った。結果は表1に示す。いずれの培養液についても強い活性が検出された。プラスミドをトランスフェクトしないCOS細胞の培養上清には、活性は検出されなかった。

【0082】

【表1】

発現プラスミド	ペプチド	活性 (u/ml)
pSV2TMD1	D123	104
pSV2TMD7	E456	221
なし	なし	検出されず

【0083】(e) エピトープの決定

前述の実施例1-(6)-(a)で得られた抗ヒトTMモノクローナル抗体1、2のエピトープの決定は、以下の方法で行なった。前述の実施例1-(6)-(c)で得られた2種の培養液をそれぞれ0.1M重炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.2)で2倍、4倍に希釈し、50μl/穴となるように96穴の平底ELISA用マイクロタイタープレート(DYANATECK社)に分注する。3時間後、プレートの穴を0.1M重炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.2)で洗浄し、1%BSA含有PBSを100μl/穴となるように入れ4℃、一晩ブロッキングを行なう。プレートの各穴を0.05%Tween20含有PBSで3回洗浄後、抗TMモノクローナル抗体1あるいは、2を含むハイブリドーマの培養上清を5

*0μl/穴となるように入れ、25℃、2時間反応させる。プレートの各穴を0.05%Tween含有PBSで3回洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体(VECTOR LABORATORIES, INC. PI-2000)を1%BSA含有PBSで1000倍希釈し、100μl/穴で各穴に加え、25℃で1時間反応させた。

【0084】プレートの各穴を0.05%Tween含有PBSで5回洗浄後、発色液(30mgオルトフェニレンジアミンを20mlクエン酸リン酸緩衝液に30%過酸化水素液を70μl添加した液)100μlを添加し、適度な発色が得られた時点で50μlの4.1M硫酸液を添加し反応を止め、492nmの測定波長で測定した。結果を表2に示すが、抗TMモノクローナル抗体

※50

1、2いずれもD123を含む培養液を入れた穴では発色がみられたが、E456を含む培養液の入った穴では、発色がみられなかった。モノクローナル抗体を含まない培地を加えた場合は、発色はみられなかった。以上の結果より抗TMモノクローナル抗体1、2のエピト---

* プは、いずれもTMの活性ドメインであるE456以外の部分であることが明らかになった。

【0085】

【表2】

抗TMモノクローナル抗体	希釈	固相抗原 (培養液)	A492
1	2	D123	0.524
1	4	D123	0.260
1	2	E456	0.004
1	4	E456	0.004
2	2	D123	0.448
2	4	D123	0.220
2	2	E456	0.003
2	4	E456	0.004
なし	2	D123	0.005
なし	4	D123	0.003
なし	2	E456	0.003
なし	4	E456	0.002

【0086】(f) モノクローナル抗体カラムの作製
抗TMモノクローナル抗体2は、ハイブリドーマを組織適合性動物、ヌードマウス等の腹腔内にて増殖させて得た腹水より、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAカラム等の分離精製操作により精製した。このようにして精製した抗TMモノクローナル抗体を、それぞれCNBr-activated Sepharose 4B (ファルマシア社、52-1153-00-A I) にファルマシア社のマニュアル (Affinity Chromatography principles & methods) に従いカップリングし、モノクローナル抗体カラムを作製した。

【0087】このようにして作製したカラムは、抗TMモノクローナル抗体カラム2と称した。上記実施例1-(7)-(b)で得られたペプチドTMD123を含む培養液300mlを0.15MNaCl含有20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したQセファロースカラムに吸着させ、0.18MNaCl含有20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で洗浄後、0.3MNaCl含有5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で溶出させた。この画分にNaClを終濃度0.5Mとなるように添加し、次いで、上記行程で作製した抗TMモノクローナル抗体カラム2を0.5MNaCl含有20mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化した後に、この画分を通し活性画分を吸着させ、平衡化するのに用いた緩衝液で洗浄後、0.5MNaCl含有0.2Mグリシン・塩酸緩衝液(pH4.0)で溶出することにより活性画分を得た。

【0088】この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白

※質の分子吸光係数にならう10.0 ($E_{1\text{cm}}^{1\text{cm}} \cdot 280 \text{ nm} = 10.0$) と規定して、それに基づき精製品の量を計算したところ約200μgであった。また、精製品をポリアクリルアミドゲル濃度10%のSDS-PAGEプレートを用い電気泳動を行ない、CBB (クマシーブリリアントブルー) 染色を行ないバンドを観察したところ分子量85kDaのシングルバンドが観察された。

【0089】(g) ELISAによる定量

前述の実施例1-(4)で得られたペプチドの精製品について実施例1-(6)-(a)で得られた抗TMモノクローナル抗体1、2を用いたELISAにより定量を行なった。ペプチドD123の標準品としては、前述の実施例1-(6)-(f)で得られた精製品を用いた。即ち、実施例1-(6)-(a)で得られた抗TMモノクローナル抗体1の精製品を200μg/mlとなるよう0.1M重炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.6)で希釈し、50μl/穴となるように96穴の平底ELISA用マイクロタイタープレート(DYNATECH社)に分注する。室温で2時間静置後、プレートの穴を200μlのPBS(日本)で5回洗浄する。

【0090】その後、0.5%BSA含有PBSを100μl/穴となるように加え、室温で2時間静置する。プレートの各穴を0.05%Tween80含有PBSで5回洗浄後、前述の実施例1-(4)で得られた精製ペプチドを0.05%Tween80含有PBSで希釈し、100μl/穴となるように入れ、25℃、2時間反応させる。プレートの各穴を0.05%Tween80含有PBSで5回洗浄後、各穴を100μlのTMB(日本)で5分間反応させる。その後、各穴を50μlのH2O2(日本)で5分間反応させる。最後に各穴を50μlのPBSで5回洗浄する。

【0091】この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白

29

有 PBS で 5 回洗浄後、ビオチン化抗マウス IgG 抗体 (VECTOR LABORATORIES, INC. BA-2000) を 1% BSA 含有 PBS で 1000 倍希釈し、100 μl / 穴で各穴に加え、室温で 1 時間反応させた。

【0091】プレートの各穴を 0.05% Tween 含有 PBS で 5 回洗浄後、アビジン D (Vector 社、A-2004) を 1% BSA 含有 PBS で 10000 倍希釈し、100 μl / 穴で各穴に加え、室温で 1 時間反応させた。プレートの各穴を 0.05% Tween 含有 PBS で 5 回洗浄後、発色液 (30 mg オルトフェニレンジアミンを 20 ml クエン酸リン酸緩衝液に 30% 過酸化水素液を 70 μl 添加した液) 100 μl 添加し、適度な発色が得られた時点での 50 μl の 4.1 M 硫酸液を添 *

30

* 加し反応を止め、492 nm の測定波長で測定した。ELISA での定量結果、及び実施例 1-(5) の活性の測定結果より、比活性を算出した。結果を表 3 に示す。

【0092】未変異の D123 と比較して、TB1、TB2、TB3、TB4、TB5、TB7 で比活性の低下がみられ、これらの位置のアミノ酸残基がプロテイン C 活性化促進の過程におけるトロンビンとの結合に関与しており、その中でも特に、TB3、TB4、TB5 については、著しい比活性の低下がみられることにより、これら的位置のアミノ酸残基が結合に必須であることが明らかになった。

【0093】

【表3】

ペプチド	APC活性 (units/ml)	抗原量 (μg/ml)	比活性 (×10 ⁴ u/mg)
D123	115.0	2.34	4.91
TB1	61.2	2.78	2.20
TB2	78.5	3.00	2.62
TB3	5.9	1.68	0.35
TB4	3.7	0.49	0.76
TB5	1.7	0.45	0.38
TB6	17.5	0.40	4.38
TB7	10.9	0.30	3.63
TB8	14.7	0.29	5.07
TB9	18.6	0.38	4.89

【0094】

【発明の効果】本発明によれば、様々な強度のトロンビン結合性を有するトロンボモジュリンを得ることができる。その結果、トロンビンの血液凝固及び血小板凝集作用に対する阻害作用及び/または、トロンビンのプロテイン C 活性化の促進作用を有する上述した新規なペプチドが得られた。

※【配列表】

【0095】配列番号：1

配列の長さ：575

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※

配列

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly			
1	5	10	15
Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu			
20	25	30	
His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala			
35	40	45	
Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser			
50	55	60	
Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly			
65	70	75	80
Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys			
85	90	95	
Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr			

31

32

100	105	110
Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn		
115	120	125
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu		
130	135	140
Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val		
145	150	155
Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg		
165	170	175
Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr		
180	185	190
Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro		
195	200	205
Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys		
210	215	220
Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro		
225	230	235
Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys		
245	250	255
Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala		
260	265	270
Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys		
275	280	285
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly		
290	295	300
Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln		
305	310	315
His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys		
325	330	335
Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr		
340	345	350
Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro		
355	360	365
Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr		
370	375	380
Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu		
385	390	395
Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp		
405	410	415
Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile		
420	425	430
Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly		
435	440	445
Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys		
450	455	460
Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys		
465	470	475
Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro		
485	490	495
Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu		

33

500	505	510
Val His Ser Gly Leu Leu Ile Gly Ile Ser Ile Ala Ser Leu Cys Leu		
515	520	525
Val Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Cys His Leu Arg Lys Lys Gln Gly		
530	535	540
Ala Ala Arg Ala Lys Met Glu Tyr Lys Cys Ala Ala Pro Ser Lys Glu		
545	550	555
Val Val Leu Gln His Val Arg Thr Glu Arg Thr Pro Gln Arg Leu		
565	570	575

【画面の簡単な説明】

【図1】実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13mp19TMJ3にディリーターTMd1が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示す。

【図2】実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1にミュテーターtb1が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミュテーターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の置換が起こっている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示す。

【図3】実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1にミュテーターtb2が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミュテーターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の置換が起こっている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示す。

【図4】実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1にミュテーターtb3が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミュテーターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の置換が起こっている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示す。

【図5】実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1にミュテーターtb4が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミュテーターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の置換が起こっている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示す。

【図6】実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1にミュテーターtb5が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミュテーターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の置換が起こっている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示す。

34

* 【図7】実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1にミュテーターtb6が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミュテーターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の置換が起こっている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示す。

【図8】実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1にミュテーターtb7が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミュテーターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の置換が起こっている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示す。

【図9】実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1にミュテーターtb8が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミュテーターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の置換が起こっている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示す。

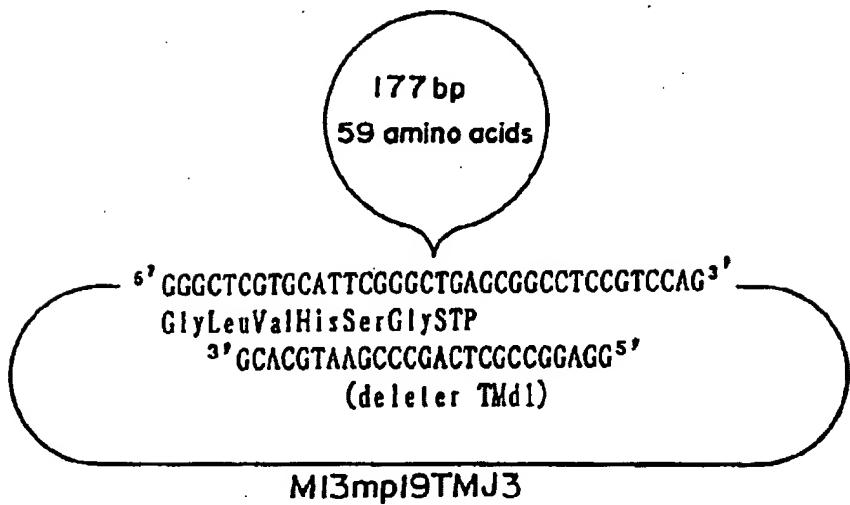
【図10】実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1にミュテーターtb9が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミュテーターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の置換が起こっている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示す。

【図11】実施例1-(1)で得られた組換え体プラスミドM13mpTMJ3にディリーターTMd3が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示す。

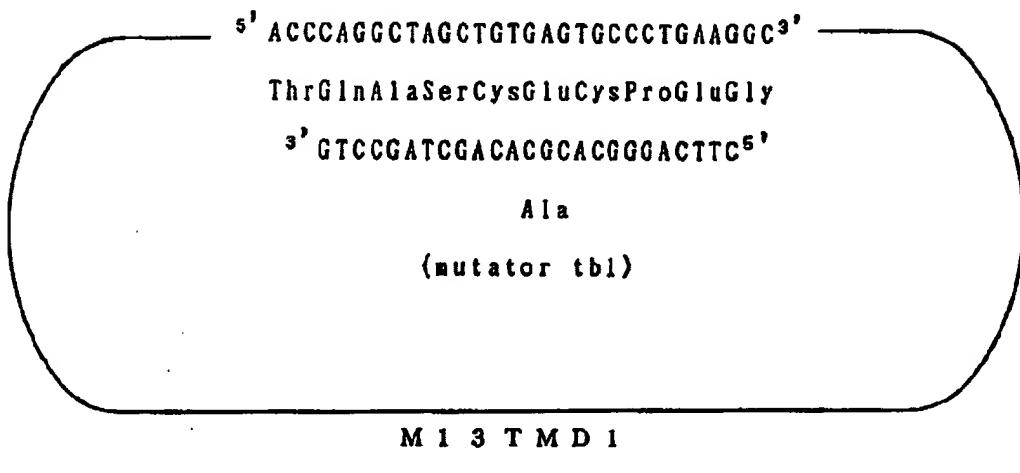
40 【図12】実施例1-(6)で得られた組換え体プラスミドM13TMD3にディリーターTMd5が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示す。

*

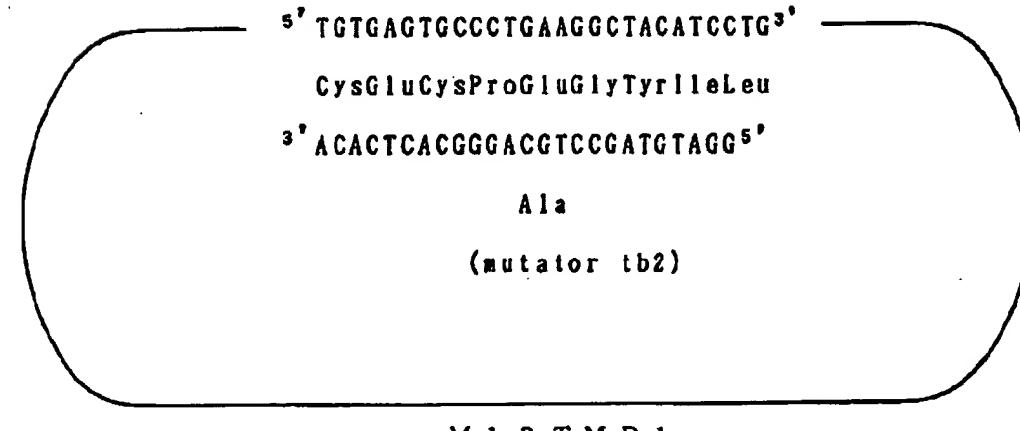
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

5' GAAQGCTACATCCTGGACGCGGTTTCACTCTGCACG 3'

GluGlyTyrIleLeuAspAspGlyPheIleCysThr

3' CCGATGTAGGACCCCGCCAAAGTAGACG 5'

AlaAla

(mutator tb3)

M 1 3 T M D 1

【図5】

5' GGTTTCATCTGCACGGACATCGACGAGTGGAA 3'

GlyPheIleCysThrAspIleAspGluCysGlu

3' AAGTAGACOTGCCGGTAGCTQCTCACG 5'

Ala

(mutator tb4)

M 1 3 T M D 1

【図6】

5' ATCTGCACGGACATCGACGAGTGGAAAAACGGCGGC 3'

IleCysThrAspIleAspGluCysGluAsnGlyGly

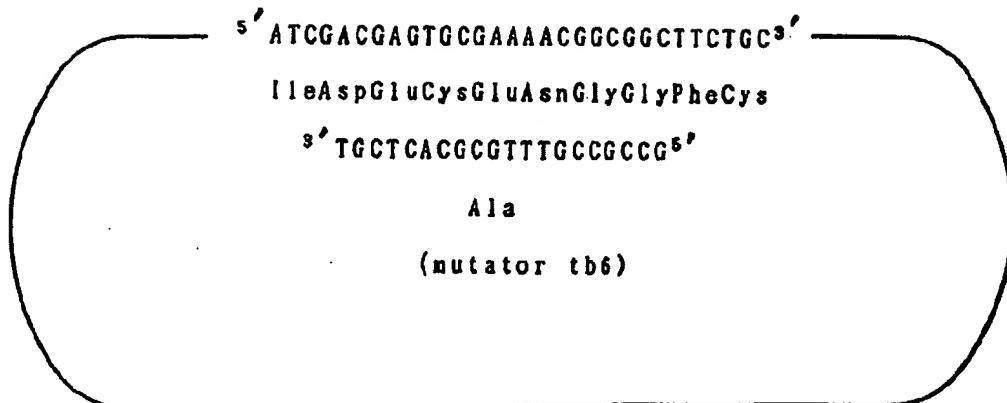
3' ACGTGCCTGTAGCGGCGCACGGTTTGCCG 5'

AlaAla

(mutator tb5)

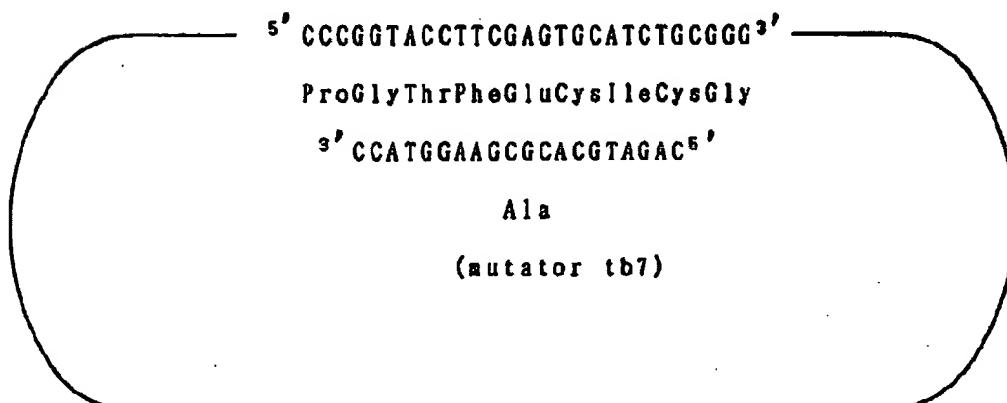
M 1 3 T M D 1

【図7】



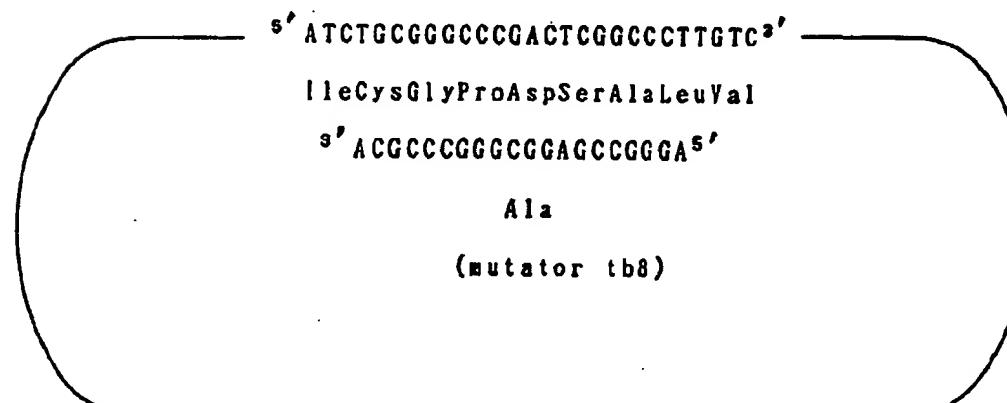
M 1 3 T M D 1

【図8】



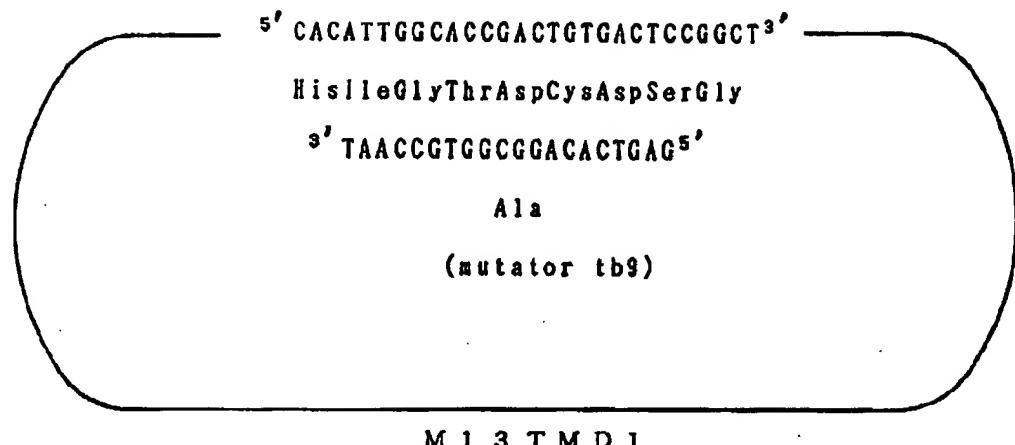
M 1 3 T M D 1

【図9】



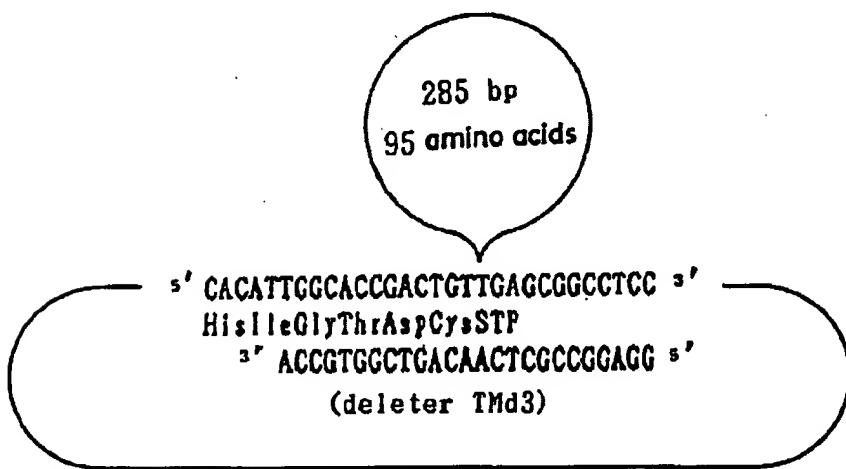
M 1 3 T M D 1

【図10】



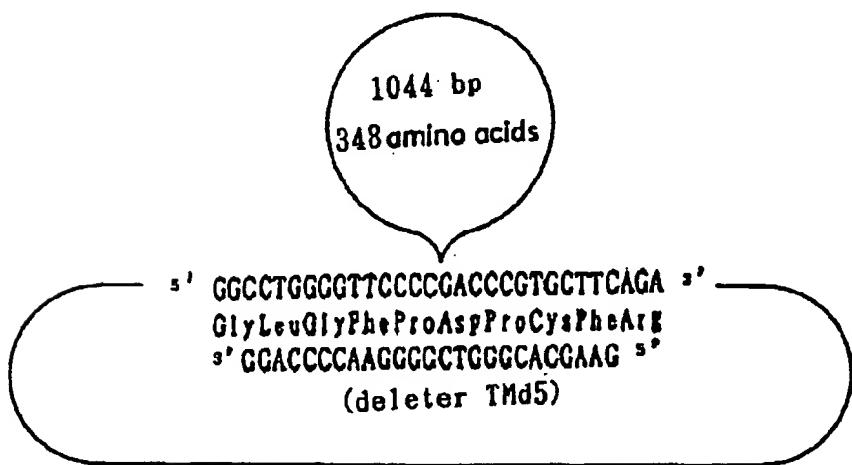
M 1 3 T M D 1

【図11】



M 13mpl9TMJ3

【図12】



M13TMD3

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/15		7236-4B		
5/10				
15/12				
C 1 2 P 21/02		C 8214-4B		
//(C 1 2 N 1/15				
C 1 2 R 1:645)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:645)				
C 0 7 K 99:00				

(54) NEW POLYPEPTIDE

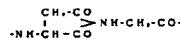
- (11) 5-310787 (A) (43) 22.11.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 4-112903 (22) 1.5.1992
 (71) ASAHI CHEM IND CO LTD (72) MICHITAKA ZUSHI(2)
 (51) Int. Cl^s. C07K7/10,A61K37/02,C07K13/00,C12N1/15,C12N5/10,C12N15/12,
 C12P21/02//(C12N1/15,C12R1/645)(C12P21/02,C12R1/91)(C12P21/02,
 C12R1/645),C07K99/00

PURPOSE: To obtain a new polypeptide having inhibitory action on coagulation of thrombin and blood platelet aggregation and/or promoting action on protein C activation of thrombin.

CONSTITUTION: In an amino acid sequence of human thrombomodulin, an amino acid residue playing an important role in bonding to thrombin when a promoting action on activation of protein C with thrombin develops, is identified to prepare a thrombomodulin having integrity of various strength. Since the polypeptide has inhibitory action on coagulation of thrombin and blood platelet aggregation and/or promoting action on protein C activation of thrombin, the polypeptide is useful as a medicine or treating and preventing diseases followed by coagulation.

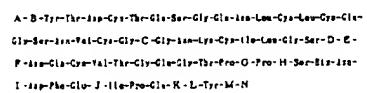
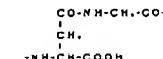
(54) RELATIVE SUBSTANCE OF HIRUDIN AND ANTICOAGULANT

- (11) 5-310788 (A) (43) 22.11.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 4-135582 (22) 30.4.1992
 (71) NIKKO KYODO CO LTD (72) SATORU MURAMATSU(1)
 (51) Int. Cl^s. C07K7/10,A61K37/64//C12N9/99,C12N15/15,C12P21/02(C12P21/02,
 C12R1/19),C07K99/00



PURPOSE: To obtain a new hirudin relative substance useful as an anticoagulant, having anti-thrombin activity, reducing extension of bleeding time, comprising a specific amino acid sequence containing a peptide residue having formed a succinimide group and β -transition substance.

CONSTITUTION: Escherichia coli JM109 strain (FERM P-3,104) transformed with a plasmid containing DNA of a hirudin relative substance having formed a succinimide group and β -transition substance obtained by variation of hirudin as an anticoagulant factor secreted from salivary gland of Hirudo medicinalis is cultured, the culture solution is centrifuged, the supernatant liquid is purified by an ion exchange column chromatography to give the objective hirudin relative substance of the formula III (A is Val, etc.; B is Thr, etc.; C is Gln, etc.; D is group of formula I or formula II; E is Gln, etc.; F is Lys, etc.; G is Asn, etc.; H is Gln, etc.; I is Asp-Gly, etc.; J is Gln, etc.; K is Gln, etc.; L is Ala, etc.; M is Len, etc.; N is Gln, etc.) containing succinimide of formula I or β -transition substance of formula II.



III

(54) BOVINE ENDOTHELIN RECEPTOR

- (11) 5-310793 (A) (43) 22.11.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-306429 (22) 21.11.1991 (33) JP (31) 91p.226204 (32) 5.9.1991
 (71) CHICHIBU CEMENT CO LTD (72) SHIGEHISA HIROSE(1)
 (51) Int. Cl^s. C07K13/00,C12N1/21,C12N15/12,C12P21/02//A61K37/02(C12N1/21,C12R1/19)

PURPOSE: To produce a large amount of a new nonselective type endothelin receptor from an animal except rat.

CONSTITUTION: A nonselective type endothelin receptor (bovine ET_B endothelin receptor) is isolated from a bovine lung and purified to elucidate its base sequence and amino acid sequence and to produce bovine ET_B endothelin receptor by genetic engineering. Spread from elucidation of mechanism of ischemic tissue disorder to therapeutic agent, diagnosticum and preventive can be expected from analysis of endothelin receptor having plural subtypes.